

19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

11) N° de publication : 2 706 487  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

21) N° d'enregistrement national : 93 07171

51) Int Cl<sup>5</sup> : C 12 P 21/02 , 21/08 , C 07 K 7/08 , C 12 N 15/12 ,  
C 12 Q 1/68 , C 07 H 21/04 , G 01 N 33/50 , 33/577

12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22) Date de dépôt : 15.06.93.

30) Priorité :

43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 23.12.94 Bulletin 94/51.

56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule.*

60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

71) Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE  
ATOMIQUE, établissement public — FR.

72) Inventeur(s) : Angulo-Mora Jaime Francisco, Tissier  
Agnès, Frelat Gérard, Mauffrey Philippe et Guilly  
Marie-Noëlle.

73) Titulaire(s) :

74) Mandataire : Cabinet Ores.

54) Préparation purifiée de protéine kin17 et ses applications, notamment au dépistage de remaniements chromosomiques.

57) Préparation purifiée de la protéine kin17 de souris.  
Ladite préparation purifiée de la protéine kin17 de souris est caractérisée en ce qu'elle présente un "doigt de zinc" capable de fixer les ions Zn<sup>2+</sup> réactifs, en ce qu'elle est capable de reconnaître l'ADN simple- ou double-brin et notamment les régions courbées de l'ADN double-brin, en ce qu'elle présente un poids moléculaire apparent de 43 000 daltons, et en ce qu'elle est reconnue aussi bien par les anticorps anti-protéine kin17 que par les anticorps anti-protéine recA d'E. coli.

Les fragments peptidiques de cette préparation sont aptes à être utilisés comme réactifs de détection de la protéine kin17, pour surveiller, évaluer et apprécier l'exposition des mammifères, notamment de l'homme, aux différents agents génotoxiques.

TABLEAU I

Protéine	Protéine	Protéine	Protéine	Protéine	Protéine
1	2	3	4	5	6
100	100	100	100	100	100
110	110	110	110	110	110
120	120	120	120	120	120
130	130	130	130	130	130
140	140	140	140	140	140
150	150	150	150	150	150
160	160	160	160	160	160
170	170	170	170	170	170
180	180	180	180	180	180
190	190	190	190	190	190
200	200	200	200	200	200
210	210	210	210	210	210
220	220	220	220	220	220
230	230	230	230	230	230
240	240	240	240	240	240
250	250	250	250	250	250
260	260	260	260	260	260
270	270	270	270	270	270
280	280	280	280	280	280
290	290	290	290	290	290
300	300	300	300	300	300
310	310	310	310	310	310
320	320	320	320	320	320
330	330	330	330	330	330
340	340	340	340	340	340
350	350	350	350	350	350
360	360	360	360	360	360
370	370	370	370	370	370
380	380	380	380	380	380
390	390	390	390	390	390
400	400	400	400	400	400
410	410	410	410	410	410
420	420	420	420	420	420
430	430	430	430	430	430
440	440	440	440	440	440
450	450	450	450	450	450
460	460	460	460	460	460
470	470	470	470	470	470
480	480	480	480	480	480
490	490	490	490	490	490
500	500	500	500	500	500

FR 2 706 487 - A1

La présente invention est relative à une préparation purifiée de protéine kin17 de souris, à son procédé d'obtention et à ses applications, notamment à la production d'anticorps et à la détection des protéines kin17 de mammifères, des gènes ainsi que des produits de transcription KIN-17 de mammifères et au dépistage de remaniements chromosomiques chez les mammifères et notamment l'Homme.

La présente invention est également relative aux séquences d'ADNs génomiques murins et humains ainsi qu'à la séquence de l'ADNc humain, aux oligonucléotides qui permettent la détection des gènes KIN17 ou des produits de transcription correspondants, aux vecteurs d'expression ou plasmides portant lesdites séquences ainsi qu'aux bactéries contenant lesdits vecteurs.

De nombreux agents génotoxiques provoquent des lésions ou altérations de l'ADN et bloquent la réplication de l'ADN ; pour assurer la survie cellulaire et le maintien de l'intégrité de l'ADN, une série de systèmes de sauvegarde existent aussi bien chez les bactéries que chez les organismes supérieurs tels que les mammifères ; en particulier, de nombreux gènes sont induits afin de rétablir la structure normale de l'ADN et participent ainsi au processus de réparation de ce dernier.

Ce processus a été particulièrement bien étudié chez la bactérie *Escherichia coli*, chez laquelle un ensemble de gènes appelé système SOS, est impliqué dans la réparation de l'ADN. Ces gènes, sous le contrôle d'un même répresseur, sont induits par les lésions de l'ADN. Une protéine, la protéine recA, joue un rôle central dans ce processus de réparation : c'est en effet son activation qui va déclencher la réponse SOS, en inactivant par clivage le répresseur des gènes SOS ; en plus d'un rôle de régulation, cette protéine RecA a un rôle enzymatique direct dans la recombinaison et intervient dans le processus de mutagénèse. De manière plus précise [A.I. ROCA

et al., (Biochemistry and Molecular Biology, 1990, 25, 415-456)], la protéine recA participe à la recombinaison de façon essentielle et favorise :

(i) l'inactivation de la protéine lexA, qui a  
5 un rôle de répresseur des gènes du système SOS,

(ii) elle est également impliquée dans le processus de mutagénèse et dans la réplication de l'ADN stable.

A.I ROCA et al. ont, en particulier, étudié la  
10 structure de cette protéine recA, qui comprend 352 aminoacides. Cette protéine se lie à l'ADN de manière assez complexe (liaison à deux molécules d'ADN) et une étude plus fine de sa structure a montré que la région C-terminale est impliquée dans les interactions protéine-  
15 protéine ainsi que dans l'activité protéique et que les 17 aminoacides C-terminaux ne sont pas essentiels pour les opérations de recombinaison homologue, de résistance aux U.V. et d'induction de la réponse SOS. La région N-terminale interviendrait dans le processus d'auto-assem-  
20 blage de la protéine.

Chez les mammifères, on connaît quelques gènes qui interviennent dans la réparation par excision, mais les gènes responsables de la recombinaison et de la mutagénèse n'ont pas encore été clairement identifiés.

25 Toutefois, une protéine nucléaire de souris, kin17, a été mise en évidence par l'un des Inventeurs [Angulo J.F. et al, (Mutation Res., 1989, 123-134)] et est immunologiquement reliée à la protéine recA d'*E. coli*, son identification ayant été possible à l'aide  
30 d'anticorps anti-recA d'*E. coli*, chez des cellules de rat FR 3T3. La production de cette protéine kin17 est induite par les agents génotoxiques, comme le rayonnement ultraviolet. Elle a une localisation préférentiellement nucléaire. De plus, elle est minoritaire parmi les pro-  
35 téines cellulaires et très sensible à la protéolyse enzymatique.

Elle est vraisemblablement impliquée dans le métabolisme de l'ADN, dans la mesure où elle augmente lors de certaines phases cellulaires de la synthèse de l'ADN et dans la réparation et où elle s'accumule dans le noyau après altération de l'ADN.

Poursuivant ses travaux, J.F. ANGULO et al. (Biochimie, 1991, 73, 251-256) ont caractérisé des anticorps anti-recA monospécifiques, aptes à être utilisés pour détecter l'expression de ladite protéine kin par des vecteurs d'expression. Ces Auteurs ont ainsi mis en valeur un fragment d'ADNc dénommé KIN17<sub>601</sub>, dérivé de l'ARN embryonnaire de souris et exprimant un polypeptide (kin17<sub>200</sub>) qui présente des réactions croisées avec les anticorps anti-recA.

La comparaison de la séquence du polypeptide (kin200) codé par cet ADNc avec la séquence de la protéine recA a conduit à la mise en évidence de séquences communes correspondant à des séquences situées entre les aminoacides 309-347 de la recA.

Dans Nucleic Acids Research, (1991, 19, 5117-5123), J.F. ANGULO et al. ont identifié et exprimé l'ADNc de KIN17 (1414 bp) chez la souris, en utilisant le fragment KIN17<sub>601</sub> précité, comme sonde.

L'ADNc KIN17 présente un seul cadre de lecture ouvert, entre les positions 25 et 1198, qui code pour une protéine de 391 aminoacides (protéine kin17) qui présente un domaine de liaison au zinc (motif en "doigt de zinc") entre les résidus 28 et 50 et un déterminant antigénique du même type que celui de la protéine recA entre les positions 162 et 201.

L'existence de trois signaux de localisation nucléaire est supposée au niveau respectivement des résidus 157-160, 253-256 et 295-300 de ladite protéine kin17.

La localisation chromosomique du gène codant pour la kin17 a été effectuée par hybridation *in situ*, sur le chromosome 2, chez la souris.

Compte-tenu de ce qui précède, il paraissait important et intéressant de disposer de réactifs spécifiques, aptes à suivre l'expression du gène KIN-17 chez les mammifères, pour surveiller, évaluer et apprécier l'exposition des mammifères et notamment de l'Homme aux différents agents génotoxiques.

En conséquence, poursuivant ses études J.F. ANGULO et al. se sont donné pour but de pourvoir à des réactifs aptes à permettre la détection d'une exposition d'un mammifère et notamment de l'Homme, à un agent génotoxique. Ils ont pris pour point de départ, une préparation purifiée de protéine kin17 de souris obtenue par :

(a) surproduction de protéine kin17, à partir de bactéries porteuses de plasmides contenant l'ADNc du gène KIN17 et un promoteur inductible, par culture des dites bactéries en présence d'IPTG,

(b) séparation des bactéries ayant exprimé la dite protéine kin17,

(c) extraction des protéines par lyse des bactéries,

(d) séparation d'une fraction riche en protéine kin17, à partir de l'extrait total de protéines par chromatographie sur colonne d'héparine-AcA et élution avec un tampon d'une force ionique égale à 0,55 M NaCl,

(e) purification par chromatographie de la fraction obtenue sur une colonne d'hydroxyapatite et élution par un gradient de force ionique et

(f) séparation de la fraction purifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 11 %.

Cette préparation purifiée de protéine kin17 se caractérise en ce qu'elle présente un "doigt de zinc" capable de fixer les ions  $Zn^{++}$  réactifs, en ce qu'elle est capable de reconnaître l'ADN simple- ou double-brin et notamment les régions courbées de l'ADN double-brin, en ce qu'elle présente un poids moléculaire apparent de 43 000 daltons, et en ce qu'elle est reconnue aussi bien

par les anticorps anti-protéine kin17 que par les anticorps anti-protéine recA d'*Escherichia coli*.

Les Inventeurs ont trouvé qu'une telle préparation purifiée de kin17 permet, de manière inattendue, de fournir tout un pool de réactifs aptes à détecter la protéine kin17 induite par des agents génotoxiques, tels que le rayonnement X ou ultraviolet, en particulier, et de caractériser ainsi l'interaction de cette protéine avec l'ADN courbé.

La présente invention a pour objet des fragments de la protéine kin17 purifiée et notamment :

- un fragment de 15 aminoacides (peptide D-16-Y), de séquence : Asp-Glu-Glu-LysThrAla-Lys-Phe-Ile-Glu-Glu-Gln-Val-Arg-Arg, qui correspond à la région de la protéine kin17, homologue à la protéine recA d'*E.coli* et

- un fragment de 11 aminoacides (peptide Y-13-K), de séquence : Gln-Lys-Gln-Cys-Arg-Asp-Glu-Asn-Gly-Phe-Lys, qui se trouve dans le domaine fonctionnel dénommé doigt de zinc.

De tels peptides correspondent à des zones particulièrement immunogènes et conservées de la protéine kin17 et permettent d'obtenir des anticorps polyspécifiques de mammifères.

La présente invention a également pour objet des anticorps anti-protéine kin17, caractérisés en ce qu'il sont obtenus par immunisation de mammifères et notamment de lapins avec une suspension antigénique constituée par la préparation purifiée de protéine kin17, conforme à l'invention.

La présente invention a également pour objet des anticorps anti-protéine kin17, caractérisés en ce qu'il sont constitués par des anticorps anti-fragments peptidiques tels que décrits ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux desdits anticorps, ils sont constitués par des anticorps polyclonaux.

Ces anticorps polyclonaux sont avantageusement obtenus par immunisation d'un mammifère approprié, notamment le lapin, avec un peptide ou un mélange de peptides conformes à l'invention, éventuellement couplé à une protéine convenable, telle que l'ovalbumine, la BSA  
5 notamment.

Selon un autre mode de réalisation avantageux desdits anticorps, ils sont constitués par des anticorps monoclonaux spécifiques de chacun des peptides définis  
10 ci-dessus.

Ces anticorps monoclonaux anti-fragments peptidiques sont avantageusement obtenus, d'une manière connue en elle-même par fusion de cellules spléniques de souris immunisées par un antigène constitué par l'un des  
15 fragments peptidiques tels que définis ci-dessus, éventuellement couplé à une protéine convenable, telle que l'ovalbumine ou la BSA notamment, avec des cellules myélomateuses appropriées.

La présente invention a également pour objet  
20 une séquence nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle est constituée par la séquence d'ADN génomique KIN17 murin, en ce qu'elle possède au moins deux introns, dont l'un se situe au niveau du nucléotide 137 et l'autre entre les nucléotides 339 et 429 de l'ADNc murin codant  
25 pour la protéine kin17, comprenant 1414 paires de bases et présentant la formule I représentée à la figure 1 annexée.

L'invention a également pour objet des oligonucléotides, caractérisés en ce qu'ils sont constitués  
30 par un fragment de la séquence nucléotidique de formule I conforme à l'invention.

Parmi lesdits fragments, on peut citer en particulier :

- un oligonucléotide B, caractérisé en ce  
35 qu'il présente la séquence de formule B suivante :

AGGCGGAAAGAACCAGGGGATCCC

un oligonucléotide C, caractérisé en ce qu'il présente la séquence de formule C suivante :

GCGAGTCCCAGCGGTACC

5 - un oligonucléotide D, caractérisé en ce qu'il présente la séquence de formule D suivante :

GACCTTGAAGACTCCGCTGCGAA

- un oligonucléotide E, caractérisé en ce qu'il présente la séquence de formule E suivante :

ACTGCCAAGTTCATTGAG

10 - un oligonucléotide F, caractérisé en ce qu'il présente la séquence de formule F suivante :

TTCTTCTTCTTCAGCCGGGACCTA

- un oligonucléotide G, caractérisé en ce qu'il présente la séquence de formule G suivante :

15 TCGAAGAGGAAAAGAAAAGGACCG

- un oligonucléotide I, caractérisé en ce qu'il présente la séquence de formule I suivante :

CTGGAACTTCTGAGGCGACGCTT

20 - un oligonucléotide J, caractérisé en ce qu'il présente la séquence de formule J suivante :

CCGACCATGTAAGTCATCTATCTG

- un oligonucléotide K, caractérisé en ce qu'il présente la séquence de formule K suivante :

CATCAGCCACCGAGAGCACATC,

25 - un oligonucléotide L, caractérisé en ce qu'il présente la séquence de formule L suivante :

AGCTGCTGCAGCAGCTTATCG,

- un oligonucléotide S, caractérisé en ce qu'il présente la séquence de formule S suivante :

30 AGCCCCAAGGCCATCGCCAA.

La présente invention a également pour objet des paires d'amorces pour la synthèse et/ou la détection de l'ADN génomique ou d'un produit de transcription du gène KIN17, caractérisé en ce que chaque amorce comprend 35 une séquence ou un fragment de séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus.



Selon un mode de réalisation desdites paires d'amorces, elles sont avantageusement constituées par un oligonucléotide de formule E apparié avec un oligonucléotide de formule F.

5 Selon un mode de réalisation desdites paires d'amorces, elles sont avantageusement constituées par un oligonucléotide de formule I apparié avec un oligonucléotide de formule J.

10 Selon un mode de réalisation desdites paires d'amorces, elles sont avantageusement constituées par un oligonucléotide de formule K apparié avec un oligonucléotide de formule J.

Les différentes paires d'amorces (oligonucléotide E/oligonucléotide F, oligonucléotide I/oligonucléotide J, oligonucléotide K/oligonucléotide J) permettent de détecter (et éventuellement de doser) l'ADN et l'ARN KIN17, avec une sensibilité accrue, due à l'amplification en chaîne à l'aide d'une polymérase.

20 La présente invention a également pour objet des sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence nucléotidique ou un fragment de séquence telle que définie ci-dessus, éventuellement marquée à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou un fluorochrome.

25 La présente invention a également pour objet la séquence de l'ADNc humain codant pour la protéine kin17, comprenant 2400 paires de bases.

La présente invention a, de plus, pour objet un plasmide contenant l'ADNc du gène KIN17 humain.

30 Ce plasmide, dénommé XLpHK17, a fait l'objet d'un dépôt auprès de la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes (CNCM) tenue par l'INSTITUT PASTEUR sous le n° I-1316 en date du 08 juin 1993.

35 La présente invention a également pour objet un réactif utilisable pour la détection, le diagnostic et le suivi de remaniements chromosomiques chez un mammi-

fère, après exposition à un agent génotoxique, caracté-  
risé en ce qu'il est choisi dans le groupe constitué par  
les réactifs immunologiques sélectionnés parmi la prépa-  
ration de protéine kin17 purifiée, les fragments pepti-  
5 diques, les anticorps anti-peptides et les anticorps  
anti-protéine kin17 purifiée, conformes à l'invention et  
les réactifs nucléotidiques sélectionnés parmi les sé-  
quences d'ADN génomique murin codant pour la protéine  
kin17 ou leurs fragments et les séquences d'ADNc humain  
10 codant pour la protéine kin17 ou leurs fragments.

La présente invention a également pour objet  
un procédé de dépistage de remaniements chromosomiques  
chez les mammifères, caractérisé en ce qu'il consiste à  
mettre en contact une cellule humaine (lymphocytes notam-  
15 ment) appropriée avec un réactif, tel que défini ci-des-  
sus, apte à détecter la présence d'une protéine, dont la  
production est induite par un toxique génétique.

Un tel procédé doit être suffisamment spéci-  
fique et sensible, pour détecter l'induction d'une pro-  
20 duction significativement accrue de ladite protéine par  
rapport à sa concentration basale.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit  
procédé de dépistage, on détecte la protéine kin17 pro-  
duite par une cellule appropriée, en mettant en présence  
25 ladite cellule avec un réactif immunologique sélectionné  
parmi les réactifs du groupe qui comprend une préparation  
de protéine kin17 purifiée, des fragments peptidiques de  
ladite préparation, les anticorps anti-peptides et les  
anticorps anti-protéine kin17 purifiée, conformes à l'in-  
30 vention.

Selon une disposition avantageuse de ce mode  
de réalisation, le réactif immunologique est fixé sur un  
support solide approprié.

Ledit procédé immunologique peut être avanta-  
35 geusement de type direct, de type indirect ou mettre en  
oeuvre une méthode sandwich ou bi-site.

Dans le cas d'une méthode directe, la protéine kin17 se fixe aux anticorps conformes à l'invention, préalablement fixés au support solide et des conjugués enzyme appropriée-anticorps anti-Ig humains appropriés  
5 sont ensuite révélés.

Dans le cas d'une méthode indirecte, par exemple des conjugués enzyme appropriée-préparation purifiée de protéine kin17 ou des complexes enzyme-peptides conformes à l'invention, entrent en compétition avec la  
10 protéine kin 17 produite par les cellules pour se lier au support solide revêtu d'anticorps conformes à l'invention.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit procédé de dépistage, on détecte l'ADN génomique  
15 et/ou les produits de transcription du gène KIN17,

(1) en mettant en contact l'échantillon biologique à analyser, traité pour extraire l'acide nucléique recherché avec une paire d'amorces conforme à l'invention, pour amplifier au moins un fragment dudit ADN ou  
20 ARN,

(2) après quoi, la séquence d'ADN ou d'ARN amplifiée est détectée par au moins une sonde nucléotidique conforme à l'invention.

La présente invention a également pour objet  
25 un procédé de détection d'une modification chromosomique, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) l'extraction de l'ADN ou de l'ARN à partir de cellules appropriées,

(2) leur mise en contact avec une protéine  
30 kin17,

(3) la quantification de l'ARNm KIN17,

(4) la détermination du rapport concentration ARNm KIN17/ADN total.

La présente invention a en outre pour objet un  
35 kit de détection d'une modification chromosomique chez l'Homme, caractérisé en ce qu'il comprend, outre les

réactifs usuels, des anticorps anti-protéine kin17 de souris pour l'immunodétection rapide et sensible de la protéine kin17 dans des extraits totaux de cellules humaines par Western blot ou par immunofluorescence.

5 Conformément à la présente invention, un kit de détection de la protéine kin17 par la méthode ELISA ou RIA, comprend, outre les réactifs usuels, des anticorps anti-protéine kin17 de souris et un couple d'anticorps, dirigés chacun contre un peptide choisi parmi les peptides  
10 D-16-Y et Y-13-K définis plus haut.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, avec référence aux dessins annexés dans lesquels :

15 - la figure 1 représente la séquence d'ADN génomique KIN17 murin,

- la figure 2 représente le profil d'élu-tion de la protéine kin17 de souris sur colonne d'hydroxyapatite ;

20 - les figures 3A et B illustrent la détection de la protéine kin17 dans des extraits cellulaires de souris ;

- les figures 4A et B illustrent la détection de la protéine kin17 dans des cultures primaires de  
25 fibroblastes normaux et de patients X.p. et TTD ;

- la figure 5 représente l'organisation putative intron-exon du gène KIN-17 de souris ;

- la figure 6 illustre la détection indirecte des introns dans le gène KIN-17 ;

30 - la figure 7 illustre la localisation d'une des jonctions intron-exon dans le gène KIN-17 ;

- la figure 8 illustre la mise en évidence du gène KIN-17 humain avec les oligonucléotides E et F de la région conservée du gène de souris ;

35 - la figure 9 représente les phages recombinants qui contiennent la région promotrice ;

- la figure 10 illustre la localisation des inserts des phages recombinants le long de l'ADN génomique ;

- la figure 11 représente une cartographie de restriction des phages  $\lambda$ GK9 et  $\lambda$ GK12 ;

- la figure 12 représente une séquence schématique de la protéine kin17 ;

- la figure 13 illustre les propriétés de liaison de la protéine kin17 à de l'ADN simple brin ou double brin ;

- la figure 14 montre que la liaison protéine kin17-ADN est dépendante du zinc ;

- la figure 15 illustre la liaison préférentielle kin17-structure courbée d'ADN.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces dessins, de même que les exemples qui vont suivre, sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

**EXEMPLE 1 : Détermination de la séquence génomique du gène KIN-17 de souris.**

\* Isolement des phages contenant le gène KIN-17 :

A. Criblage de la banque génomique de souris et purification des phages recombinants :

une banque d'ADN génomique de souris, clonée dans le vecteur  $\lambda$ DashII a été criblée avec une sonde d'ADN radiomarquée correspondant au fragment d'ADN complémentaire du gène KIN-17 de formule I ci-dessus (appelé Sonde-1192). L'ADN des phages recombinants, immobilisé sur des filtres de nitrocellulose a été hybridé avec la sonde-1192 radioactive.

- Matériels :

. banque : la banque a été obtenue à partir d'une digestion partielle de l'ADN de foie de souris mâles de la souche 129 par l'enzyme de restriction Sau3A.

Après la digestion, les fragments d'ADN de 15 kb sélectionnés ont été insérés au site BamHI du vecteur  $\lambda$ DashII (Stratagène). Les phages recombinants ont été sélectionnés positivement car ils sont les seuls capables de se répliquer dans une souche lysogénique pour P2 (souche SRB P<sub>2</sub>).

Fragment d'ADN utilisé pour le criblage : la sonde utilisée est un ADN double brin obtenu par amplification en chaîne à l'aide de la polymérase, contenant les nucléotides 253-1414 de la séquence de formule I [ADNc du gène KIN-17 (ANGULO et al., Nucleic Acids Research, 1991, 19, 5117-5123)]. Cet ADN a été marqué avec du dCTP $\alpha$ p<sup>32</sup> (MANIATIS et al., 1989).

- Méthode :

Dénaturation et immobilisation de l'ADN du bactériophage lambda sur des filtres de nitrocellulose.

400 000 bactériophages  $\lambda$ DashII contenant des inserts de 15 kb d'ADN génomique de souris, sont incubés 20 min à 37°C avec 0,15 ml de bactéries réceptrices DP50 (culture de 7 h à 37°C), puis mélangés avec 8 ml de milieu LB agarose à 49°C. L'ensemble est coulé sur une boîte de Pétri de 140 mm de diamètre contenant de l'agar. Les boîtes ont été incubées à 37°C, 14 heures, jusqu'à ce que les plages de lyse arrivent à confluence. Un filtre de nitrocellulose (SCHLEICHER & SCHUELL, BA85) sec a ensuite été déposé sur la surface de la boîte, marquée de façon asymétrique avec de l'encre de chine. Après 1 min de contact, ce filtre est marqué, puis traité de la façon suivante :

- le filtre est placé pendant 5 min, face en contact avec les phages vers le haut, sur des feuilles de papier Whatman imbibées de solution dénaturante (0,5 N NaOH-1,5 M NaCl), pour permettre la lyse des phages et la dénaturation de l'ADN ;

- le filtre est ensuite transféré pendant 5 min dans la solution de neutralisation (1,5 M NaCl-0,5 M

TrisCl pH = 7,4), puis est lavé pendant 10 min dans du tampon 2xSSC pour éliminer les protéines phagiques et les débris cellulaires ;

- le filtre est ensuite séché à 80°C, sous vide, pendant 2 h.

Un deuxième filtre est mis en contact 2 min avec les plages de lyse à la surface de la boîte. Il est traité de la même façon que la première empreinte.

Les boîtes contenant les phages, sont conservées à 4°C à l'obscurité. L'ADN fixé sur les filtres est alors hybridé avec la sonde-1192 radiomarquée (MANIATIS et al., 1989).

B. Hybridation des ADN recombinants avec la sonde-1192 radioactive :

15 L'ADN phagique dénaturé, immobilisé sur les membranes de nitrocellulose, est hybridé avec un fragment radioactif de l'ADNc du gène KIN-17.

- Préhybridation :

20 15 filtres de 60 cm<sup>2</sup> sont incubés pendant 2 h à 65°C avec agitation dans 10 ml de solution d'hybridation (5xSSPE-5xDenhardt's solution-0,5 % SDS) en présence de 20 µg/ml final d'ADN de sang de poulet soniqué (préalablement dénaturé à 100°C pendant 10 min, puis placé sur la glace).

25 - Hybridation :

Les filtres sont incubés avec la sonde-1192 radiomarquée (4x10<sup>4</sup> dpm/cm<sup>2</sup> de filtre/ml de volume d'incubation) pendant 14 h à 65°C avec agitation. Après hybridation, les filtres sont lavés de la façon suivante :

30 4 lavages de 5 min dans du tampon 2xSSC-0,1 % SDS à température ambiante, 1 lavage de 1 h dans du tampon 1xSSC-0,1 % SDS à 65°C.

Après élimination de l'excès de radioactivité, les filtres sont mis en contact avec des films X-OMAT AR 35 (Kodak) que l'on a placé à -80°C pendant 24 h (MANIATIS et al., 1989).

\* Isolement des phages qui portent l'ADN génomique KIN-17 :

Les plages de lyse qui donnent un signal positif par autoradiographie sont repérées sur les boîtes. 5 Les plages donnant un signal positif sont prélevées et remises en suspension dans 100  $\mu$ l de TMG contenant 5  $\mu$ l de chloroforme. Le même protocole utilisé pour le criblage permet par la suite de purifier les phages intéressants ainsi que leur ADN pour déterminer la taille des 10 inserts et la structure du gène.

A. Purification de l'ADN du phage lambda :

2 ml d'une suspension de bactéries réceptrices DP 50 ( $DO_{600} = 3$ ) sont incubés, pendant 15 min avec 3  $\mu$ l de suspension de phages concentrés à  $10^{10}$  pfu/ml. Cette 15 suspension est ensuite mise dans 200 ml de LB<sub>M</sub>. L'ensemble est agité vigoureusement dans un bain-marie à 37°C jusqu'à la lyse des bactéries (environ 8 h). 0,5 ml de chloroforme sont ensuite ajoutés et l'agitation est poursuivie pendant 10 min à 37°C. Après une centrifugation de 20 20 min à 10 000 g et à 4°C, le surnageant récupéré a un titre de  $10^{10}$  phages/ml. Une quantité de sulfate d'ammonium solide est ensuite ajoutée afin d'obtenir une saturation finale de 50 % (pour 50 % de saturation, il faut dissoudre 313 g de sulfate d'ammonium dans un volume final de 1 litre selon HARLOW and LANE, 1988). Le mélange 25 est incubé pendant 30 min sur la glace, puis centrifugé pendant 20 min à 10 000 g et à 4°C.

Le culot est repris dans 1 ml de TE-SDS contenant 20  $\mu$ g/ml final de RNase. Ce mélange est incubé 30 15 min à température ambiante. On ajoute de la protéinase K à 200  $\mu$ g/ml final. Le mélange est incubé 20 min à 60°C, puis est placé 15 min sur la glace, avant d'être centrifugé 10 min à 4°C et à 15 000 g. 2 extractions successives des protéines du surnageant sont réalisées avec du 35 phénol saturé avec du TE. Ces deux étapes ont été suivies d'une extraction au chloroforme puis d'une dernière ex-



traction avec de l'éther saturé avec de l'eau.

L'ADN ainsi purifié est précipité en présence du même volume d'isopropanol pendant au moins 30 min à 4°C, puis est centrifugé 30 min à 15 000 g et à 4°C. Le culot a été rincé 2 fois avec de l'éthanol à 70 % puis repris dans 50 µl de TE (ZIAI et al., 1989). L'ADN phagique ainsi obtenu est hydrolysé avec différentes endonucléases de restriction et les sites de coupures ont été localisés par rapport aux sites du vecteur de clonage. Une première carte de restriction est ainsi établie par hybridation des ADNs phagiques avec des oligonucléotides qui correspondent à l'ADNc KIN-17.

B. Hybridation des ADNs phagiques avec des oligonucléotides radioactifs :

1) Fixation de l'ADN sur des filtres de nylon :

On dépose à la surface d'une membrane de nylon chargée positivement (Membrane Hybond N+, Amersham) des échantillons de 5 µl, contenant respectivement  $0,5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  et  $5 \times 10^7$  phages recombinants, soit une quantité d'ADN équivalent à 250 pg, 1 000 pg et 2 500 pg d'ADN de phage lambda ( $2 \times 10^{10}$  pfu de phage lambda = 1 µg d'ADN). De même 250, 1 000 et 2 500 pg d'ADN double brin (sondes 5' et 3' de la l'ADNc de KIN-17 réalisées par PCR) sont déposés sur la même membrane pour servir de contrôle.

Traitement de la membrane : la membrane est placée sur une feuille de papier Whatman 3MM imbibée avec 5 ml de solution de dénaturation pendant 5 min, puis 5 min sur une feuille de papier Whatman imbibée de solution de neutralisation. L'ADN a été fixé à la membrane en laissant celle-ci 30 min sur un papier Whatman imbibé d'une solution 0,4 M NaOH. La membrane est rincée rapidement dans du tampon 5xSSC avant de procéder à l'hybridation avec un oligonucléotide marqué radioactivement.

2) Marquage radioactif de l'oligonucléotide :  
4 pmol d'oligonucléotides sont mélangés à 3 µl

de tampon de réaction 5 fois concentré, 3  $\mu$ l d'ATP  $\gamma^{32}$ P (10  $\mu$ Ci/ml à 5 000 Ci/mmol, Amersham), et 7 unités de polynucléotide kinase dans un volume final de 5  $\mu$ l. Après incubation à 37°C pendant 30 min, l'enzyme est inactivée par chauffage pendant 5 min à 55°C (MANIATIS et al., 1989).

3) Hybridation des membranes avec une sonde oligonucléotidique :

a) Préhybridation : le mélange réactionnel contient 4 ml de solution d'hybridation pour une membrane de nylon de 100  $\text{cm}^2$  et 20  $\mu$ g/ml final d'ADN non homologue (ADN soniqué de sang de poulet). L'ensemble est incubé pendant 2 h à une température déterminée.

Détermination de la température d'hybridation : la température d'hybridation ( $T_h$ ) dépendant de la composition en bases :

$$T_h = 2 \times (A + T) + 3 \times (G + C)$$

les lettres A, T, G et C correspondent aux 4 bases Adénine, Thymines, Guanine et Cytosine.

b) Hybridation : l'hybridation se fait pendant 3 h à  $T_h$  avec agitation en ajoutant la totalité de la solution d'oligonucléotide radioactif, soit  $2,6 \times 10^7$  dpm, à la solution de préhybridation. Après hybridation, les membranes sont lavées 2 fois pendant 5 min dans du tampon 2xSSPE-0,1 % SDS, à température ambiante et exposées pendant 14 heures avec un film X-OMAT AR (Kodak) à -80°C.

L'hydrolyse de l'ADN du gène KIN-17 et l'hybridation des ADNs phagiques avec les oligonucléotides radioactifs ont permis de proposer une première carte de restriction du gène.

- Résultats :

Le criblage de la banque d'ADN génomique de souris clonée dans le vecteur  $\lambda$ DASH II avec un fragment d'ADNc du gène KIN-17, comme spécifié ci-dessus, a permis d'isoler 11 phages recombinants qui contiennent des fragments du gène KIN-17.

L'ADN des 11 phages a été hybridé avec les oligonucléotides de synthèse C, D, E, F, G et H (voir formule I).

La figure 9 est une autoradiographie d'une membrane contenant des spots d'ADN des phages recombinants isolés et montre que l'oligonucléotide radiomarké C, qui contient l'ATG d'initiation de la phase ouverte de lecture, est reconnu spécifiquement par les phages qui portent la région 5'.

Dans cette figure,  $\lambda$ GX Ctrl est un phage contrôle qui provient de la banque mais qui n'hybride pas avec la sonde 1192 ;  $\lambda$ ckin17 est un phage dérivé du phage  $\lambda$ GT11, qui porte un fragment de 601 nucléotides de l'ADNc KIN17 entre les nucléotides 241 et 842 ;  $\lambda$ DashII est le phage dans lequel a été clonée la banque, mais sans insertion d'ADN génomique de souris ; les sondes 3' et 5' sont des fragments d'ADNc KIN-17 représentés à la formule I.

Seuls les ADN des phages  $\lambda$ GK9 et  $\lambda$ G12 contiennent l'extrémité 5' de l'ADNc autour de l'ATG qui code pour l'initiation de la synthèse protéique.

Le Tableau I ci-après montre les résultats d'hybridation obtenus avec ces différents oligonucléotides.

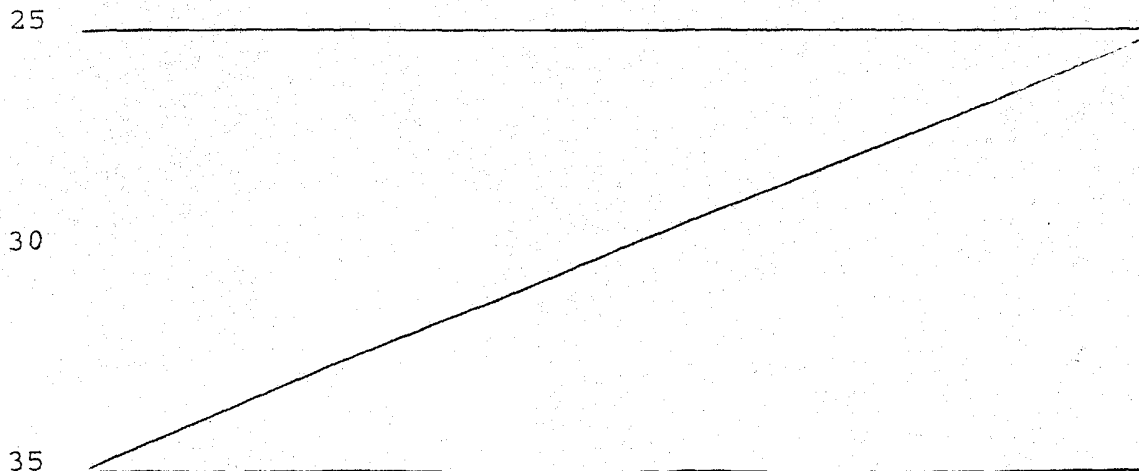


TABLEAU I

	ADN DES PHAGES OU ADN CONTROLE	OLIGONUCLEOTIDES						SONDE
		C	D	E	F	G	H	1192
5								
	$\lambda$ GK 2	-	-	-	+	+	+	+
	$\lambda$ GK 3	-	-	-	-	-	+	+
	$\lambda$ GK 4	-	-	-	+	+	+	+
10	$\lambda$ GK 5	-	-	-	-	+	+	+
	$\lambda$ GK 6	-	-	-	+	+	+	+
	$\lambda$ GK 7	-	-	-	-	-	+	+
	$\lambda$ GK 8	-	-	-	+	+	+	+
	$\lambda$ GK 9	-	+	+	+	+	+	+
15	$\lambda$ GK 10	-	-	-	+	+	+	+
	$\lambda$ GK 12	-	+	+	+	+	+	+
	$\lambda$ GK 14	-	-	-	+	+	-	+
20	$\lambda$ cKin 17	-	-	+	+	+	-	+
	$\lambda$ GX Clrt.	-	-	-	-	-	+	-
	$\lambda$ DashII	-	-	-	-	-	+	-
	SONDE 3'	-	-	-	-	+	-	+
	SONDE 5'	-	-	+	+	-	-	+

Il ressort de ce Tableau que seulement 2 phages  $\lambda$ GK9 et  $\lambda$ GK12 s'hybrident avec la totalité des oligonucléotides testés, ils contiennent donc la partie 5' et centrale du gène KIN-17. 7 autres phages,  $\lambda$ GK2, 4, 5, 6, 8, 10 et 14 s'hybrident avec les oligonucléotides F et G et contiennent donc tous vraisemblablement la partie centrale du gène. Les 2 phages restants,  $\lambda$ GK3 et 7 s'hybrident avec la sonde 1192 mais avec aucun des oligonucléotides testés. Ils semblent donc contenir la partie terminale la plus proche de l'extrémité 3' de l'ADN génomique (figure 10).

Chaque phage contenant un insert d'environ 15 kb, l'ensemble de ces 11 phages a permis d'isoler

l'ensemble du gène KIN-17.

Les cartes de restriction de ces différents phages et en particulier des phages  $\lambda$ GK9 et  $\lambda$ GK12 ont été établies après digestion par les enzymes EcoR I, BamH I, et Hind III.

La figure 11 illustre les résultats obtenus.

. Organisation intron-exon du gène KIN-17 de souris :

L'amplification en chaîne à l'aide de la polymérase (ACP) sur l'ADN génomique KIN-17 (avec des oligonucléotides qui correspondent à la séquence de l'ADN complémentaire) a donné des informations sur la localisation des exons et des introns. En effet, l'utilisation d'un couple d'oligonucléotides sur l'ADN complémentaire donne une bande majeure clairement détectable par électrophorèse sur gel. La même amplification produirait le même amplimère seulement s'il s'agissait d'une séquence sans interruption (sans introns). Avec ce type d'analyse rapide (avec le couple d'oligonucléotides E = ACTGCCAAGTT-CATTGAG et F = TTCTTCTTCTTCAGCCGGGACCTA), on a démontré que le gène KIN-17 ne possède pas d'intron entre les nucléotides 529 et 804 de l'ADN complémentaire (bande de 255 paires de bases, figure 6). Le couple E/F d'oligonucléotides permet donc de détecter (et éventuellement de doser) l'ADN et l'ARN KIN-17 avec une sensibilité accrue due à l'ACP.

Pour le couple d'oligonucléotides I/J, l'amplification de l'ADNc met en évidence une bande de 200 pb alors que l'amplification de l'ADN génomique avec ces 2 oligonucléotides ne fournit aucune amplification, de même entre les oligonucléotides K/F, on obtient une bande de 486 pb pour l'ADNc alors que l'on amplifie plus pour l'ADN génomique. La figure 5 illustre la structure de l'ADN génomique obtenu.

C. Détermination de la séquence nucléotidique de l'ADN génomique KIN-17 :

Méthode : l'ADN des phages recombinants obtenus précédemment est traité avec Prep-A-Gene (BIO-RAD) afin d'éliminer les nucléases et les ARNs. On mélange 1 pmol d'oligonucléotide radiomarqué (selon le protocole indiqué par AMERSHAM) dans un volume de 5  $\mu$ l avec 4,5  $\mu$ l de tampon de séquence (300 mM Tris-HCl pH = 9 - 50 mM MgCl<sub>2</sub> - 300 mM KCl) et 1,5  $\mu$ l d'ADN double brin de lambda, soit l'équivalent de 50 fmol dans un volume de 26  $\mu$ l et 0,5  $\mu$ l de Taq DNA polymérase (5 U/ $\mu$ l) (dsDNA Cycle Sequencing System - BRL).

Réaction de séquençage 5 min à 95°C, puis 30 cycles suivants : 1 min à 95°C, 2 min à 55°C, 2 min à 70°C [KRISHNAN et al., Nucleic Acids Res., vol. 19, p. 1153 (1990)].

La réaction est arrêtée avec 5  $\mu$ l de solution contenant 95 % de formamide, 10 mM EDTA pH = 8,0 dans chaque tube. Cette solution contient également des témoins de migration comme le Bleu de Bromophénol (0,1 %) et le Xylène Cyanol (0,1 %).

Migration sur gel de polyacrylamide : on chauffe les échantillons 5 min à 95°C avant de les déposer à la surface d'un gel 6 % de polyacrylamide. Les échantillons vont migrer pendant environ 2 h à 60 W dans du tampon TBE. Le gel est séché puis mis en contact avec des films X-OMAT AR (Kodak) à température ambiante pendant toute une nuit.

La figure 7 illustre la détermination d'une des jonctions intron-exon du gène KIN-17 et montre qu'elle coïncide avec la séquence **AG/GTAAGT**, qui a été décrite dans la littérature comme une séquence consensus de site d'épissage en 5'.

**EXEMPLE 2** : Procédé de détection du gène KIN-17 murin et humain par amplification en chaîne à l'aide de la polymérase.

Les oligonucléotides E et F définissent une séquence de 270 nucléotides de l'ADN complémentaire KIN-17 de souris. Ce fragment permet de mettre en évidence facilement les gènes KIN-17 d'autres espèces. En effet, on utilise les oligonucléotides E et F pour détecter l'ADNc du gène KIN-17 humain par ACP. L'utilisation de ces oligonucléotides dans l'ACP sur des ADNc obtenus après transcription reverse des ARN messagers permet de déterminer le taux de transcrits de gènes KIN-17.

La figure 8 représente un exemple d'utilisation des oligonucléotides E et F qui sont les oligonucléotides de la région conservée du gène de souris, pour détecter le gène KIN-17 humain.

Les oligonucléotides E et F sont localisés dans un exon du gène KIN-17 de souris. Leur utilisation dans un système d'amplification en chaîne à l'aide de la polymérase (ACP), permet donc d'amplifier un fragment d'ADN long de 270 nucléotides à partir d'une matrice d'ADN de souris. En effet, un plasmide qui contient l'ADNc du gène KIN-17 de souris a été utilisé comme matrice pour l'ACP avec le couple d'oligonucléotides d'amorce E/F.

Après ACP, les produits d'amplification ont été séparés dans un gel d'agarose à 2 %. La présence d'ADN a été révélée avec le bromure d'éthyldium.

L'émission de lumière due au complexe ADN-bromure d'éthyldium a été enregistrée comme une photographie du gel de séparation. On détecte une seule bande de 270 nucléotides après ACP sur l'ADN plasmidique (voir figure 8, ligne 6 : couple d'oligonucléotides E-F sur une matrice d'ADNc murin). La conservation de la séquence du gène KIN-17 chez l'Homme a permis aux Inventeurs d'utiliser les oligonucléotides E/F pour amplifier un fragment

d'ADN de la même longueur, à partir de l'ADNc du gène KIN-17 humain (voir figure 8, ligne 5 : couple d'oligonucléotides E-F sur une matrice d'ADNc humaine).

La même figure montre que l'utilisation d'autres couples d'oligonucléotides dérivés de la séquence de l'ADNc de souris conduit à l'amplification des fragments d'ADN de longueurs différentes après ACP sur de l'ADNc humain ou murin. Cela est probablement dû à une diminution de la spécificité et de la capacité de ces couples d'oligonucléotides pour amorcer la réaction d'ACP (voir couples I-J et K-F, lignes 1 à 4 de la figure 8). Les deux dernières lignes de cette figure (7 et 8), marquées par MT (Marqueur de Taille), correspondent aux standards de longueur de fragments d'ADN qui ont permis de déterminer la longueur de fragments amplifiés par ACP. Dans la ligne 7 : les produits de l'hydrolyse de l'ADN du phage  $\lambda$  par l'enzyme Hind3. Dans la ligne 8 : les produits de l'hydrolyse de l'ADN du plasmide pBR322 par l'enzyme Hae2.

20 **EXEMPLE 3 : Isolement de l'ADNc du gène KIN-17 humain.**

Comme l'expression du gène KIN-17 semble affectée dans certaines maladies liées à la réparation de l'ADN, on décide d'isoler l'ADNc et la séquence génomique du gène KIN-17 humain. On crible donc des banques d'ADNc humain faites dans des vecteurs d'expression à l'aide des anticorps dirigés contre des parties conservées de la protéine kin17.

1) Fabrication d'anticorps anti-peptides de synthèse :

30 l'analyse de la structure primaire de la protéine kin17 de souris a permis de mettre en évidence deux régions particulièrement immunogènes selon la prédiction globale d'antigénicité (Fraga). On a donc commandé la synthèse chimique de deux polypeptides qui sont dans ces  
35 régions :

a) le polypeptide D-16-Y (séquence : DEEKTAK-



FIEEQVRR), qui correspond à la région de la protéine kin17 qui est homologue à la protéine recA d'*E. coli* et

b) le polypeptide Y-13-K (séquence : QKQCR-DENGFK), qui se trouve dans un domaine fonctionnel nommé  
5 doigt de zinc.

Dans les deux cas, les polypeptides sont couplés à l'ovalbumine d'une façon covalente. L'ovalbumine est une protéine porteuse d'un poids moléculaire de 43 000 daltons (travail effectué à façon dans le laboratoire privé NEOSYSTEM, Strasbourg). Les complexes peptide-ovalbumine sont injectés à des lapins comme décrit précédemment dans l'exemple 2. Les sera des différents lapins ont été collectés et testés par ELISA pour vérifier la spécificité des immunoglobulines produites par rapport aux polypeptides synthétiques. On vérifie que les  
10 sera obtenus reconnaissent la protéine kin17 native et dénaturée.  
15

2) Criblage d'une banque d'expression d'ADNc humain :

20 a) Etalement de la banque :

des ADNc humains obtenus à partir d'ARNm exprimés dans des cellules testiculaires ont été insérés dans le vecteur d'expression  $\lambda$ gt11 (titre de la banque :  $6 \cdot 10^8$  pfu/ml). 100 ml de suspension bactérienne et 5  $\mu$ l de la suspension de phages recombinants sont incubés pendant 30 min à 37°C. Le mélange est ensuite versé (phages + bactéries) dans 8 ml de LB-AGAROSE à 48°C et déposé dans 5 grandes boîtes de Pétri (diamètre 150 mm). Les boîtes sont incubées à 42°C jusqu'à l'apparition de  
25 plages de lyse (environ 4 heures). Les boîtes contiennent respectivement 15 000, 18 000, 22 000, 27 000 et 35 000  
30 plages de lyse. Une membrane de nitrocellulose préalablement imbibée dans une solution d'IPTG 1 mM est déposée sur les boîtes qui sont ensuite incubées à 37°C toute la  
35 nuit.

b) Détection immunologique des protéines pha-

giques sur des membranes de nitrocellulose :

Les membranes sont rincées 10 min dans 50 ml de TBS avec agitation puis incubées dans une solution à 3 % d'albumine bovine dans du TBS pendant 1 heure. Les membranes sont incubées avec l'anticorps anti-KIN17 (dilué 1/1000 dans du TBS), pendant 1 heure avec agitation. Elles sont ensuite rincées 3 fois pendant 10 min en TBS-Tween à 0,1 % puis incubées avec un anticorps anti-IgG de lapin (1/7500) pendant 30 min avec agitation. 3 rinçages de 10 min sont effectués avec du TBS contenant 0,1 % de Tween. Finalement, la détection des complexes formés entre l'antigène et les deux anticorps est réalisée avec le substrat BCIP/NBT comme décrit dans l'exemple 3.

c) Isolement de trois phages recombinants et détermination de leur séquence nucléotidique.

**EXEMPLE 4** : Préparation purifiée de protéine kin17 de souris.

- Surproduction de protéines :

La préparation du plasmide qui contient l'ADNC du gène kin17 et l'obtention de la souche d'*E. coli* qui surproduit la protéine kin17 de souris sont décrites dans l'article de J.F. ANGULO et al. (Nucleic Acids Research, 1991, vol. 19, pages 5117-5123) et sont rappelées ci-dessous.

Les bactéries qui portent le plasmide sont cultivées en milieu liquide LB (MANIATIS et al., 1982).

Lorsque les cellules sont en phase de croissance exponentielle à une DO de 0,6 unité à 600 nm, on ajoute de l'IPTG à une concentration finale de 1 mM (système de clonage décrit par STUDIER et al., Methods Enzymol., 1990, 185, 60-69). Après trois heures, les bactéries sont récupérées par centrifugation et lysées en présence d'urée et de Triton X-100. L'extrait total des protéines bactériennes est déposé sur une colonne d'héparine-AcA (IBF, France) suivant un protocole inspiré de

l'article de DESCOMBES et al. (Genes and Development, 1990, 4, 1545-1551). Une fraction riche en protéine kin17 est éluée de la colonne avec un tampon d'une force ionique égale à 0.55 M NaCl.

5 - Chromatographie de la protéine kin17 sur une colonne d'hydroxylapatite :

Les réglages de l'appareil ont été effectués en suivant les indications du constructeur (système econo column de BIORAD). On utilise une cartouche d'hydroxylapatite (BIORAD) avec un volume mort de 2,2 ml et un volume total de 5,2 ml. Les protéines sont détectées par leur absorption en UV à 280 nm. La séparation par chromatographie d'affinité a été réalisée avec une augmentation de la concentration du tampon phosphate 10 mM pH 6,8 ;  
10 10 % glycérol, 1 mM beta-Mercapto-éthanol ; 0,001 % thymérosal comme tampon de départ contenu dans la cellule A, à un tampon phosphate 1500 mM pH 6,8 : 10 % glycérol, 1 mM beta-Mercapto-éthanol ; 0,001 % thymérosal comme tampon concentré, contenu dans la cellule B.

20 On obtient 5 pics (numérotés de 1 à 5 sur la figure 2), qui ont été analysés par électrophorèse en gel dénaturant (LAEMMLI E.K., 1970, Nature, 227, 680-685) et par immunodétection sur membrane de nitrocellulose (TOWBIN H. and GORDON J., 1984, PNAS, 76, 4350-4354).  
25 Seules les protéines de la fraction 5 ont révélé une bande majeure avec un poids moléculaire apparent de 43 000 daltons qui est reconnue par les anticorps anti-protéine kin17.

**EXEMPLE 5** : Obtention d'anticorps anti-protéine kin17 de  
30 souris.

Les protéines de la fraction riche en protéine kin17 obtenues par chromatographie sur une colonne d'hydroxylapatite (exemple 4) sont ensuite soumises à une séparation électrophorétique sur un gel 11 % de polyacrylamide selon les protocoles décrits par LAEMMLI  
35 (LAEMMLI U.K., 1970, Nature, 227, 680-685).

Protocole de séparation de la protéine kin17 par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 11 % :

Mélanger 200  $\mu$ l d'une solution qui contient 400  $\mu$ g de protéines avec le même volume du tampon d'échantillon deux fois concentré. Laisser 10 minutes à 100°C pour dénaturer les protéines. Déposer 400  $\mu$ l de la solution de protéines ainsi traitées (contenant 400  $\mu$ g) sur le gel. Brancher les électrodes au générateur et appliquer un voltage constant de 200 V. Arrêter la migration quand le bleu de bromophénol a atteint l'extrémité du gel. Les protéines du gel sont ensuite visualisées par une coloration *in situ* avec le chlorure de cuivre (LANE D., 1988). La bande majeure qui correspond à la protéine kin17 est excisée du gel de polyacrylamide et complètement désagrégée. Les particules fines qui résultent de la désagrégation mécanique du gel sont émulsionnées avec l'adjuvant de Freund (proportion volume/volume). L'émulsion d'antigène ainsi obtenue est utilisée pour immuniser les lapins. 50  $\mu$ g de la protéine kin17 émulsionnée ont été injectés, dans les coussinets plantaires, à deux lapins mâles blancs de Nouvelle-Zélande, âgés de six mois. Pour la première injection, l'émulsion est réalisée avec de l'adjuvant de Freund complet. Les injections postérieures ont été réalisées tous les 15 jours avec 50  $\mu$ g de la protéine kin17 émulsionnée avec l'adjuvant de Freund incomplet. Après la troisième injection, des prélèvements de sang sont utilisés pour obtenir le sérum. Ce sérum est capable de détecter la protéine kin17 dans un mélange complexe de protéines déposées sur un filtre de nitrocellulose.

**EXEMPLE 6 : Procédé de détection immunologique des protéines kin17 de souris et humaine.**

Le protocole de séparation de la protéine kin17 par électrophorèse décrit dans l'exemple 5 est appliqué à des extraits protéiques de cellules de mammières (de souris ou humaines). Les protéines, séparées en

fonction de leur poids moléculaire, sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce à l'action d'un champ électrique. La membrane de nitrocellulose ainsi obtenue est incubée avec une solution 3 % d'albumine bovine dans du tampon TBS (150 mM NaCl, 50 mM TrisCl  
5 pH 7,5), pendant 1 heure à 21°C puis avec le sérum total anti-protéine kin17 (dilué 1 000 fois dans du tampon TBS).

Après une incubation de 1 heure, la membrane  
10 est lavée trois fois pendant 5 minutes avec le tampon TBS. La membrane est finalement incubée 60 minutes avec un anticorps anti-IgG de lapin conjugué à la phosphatase alcaline (Promega, COGER) dilué 7 500 fois avec du TBS. La membrane est lavée trois fois avec le tampon TBS puis  
15 l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline est mise en évidence grâce aux substrats : bromochloroindolyl phosphate et nitro blue tétrazolium (BCIP/NBT). En résumé, l'apparition d'une bande bleue indique la présence de la protéine recherchée. L'identité de la bande détec-  
20 tée est établie par des expériences de compétition avec la protéine kin17 pure.

La figure 3 illustre la détection de la protéine kin17 dans des extraits cellulaires de souris et la compétition avec la préparation purifiée de la protéine  
25 kin17.

La figure 3A : des extraits protéiques totaux des cellules de *E. coli* qui produisent la protéine kin17 et des extraits totaux de la lignée cellulaire de souris AtT-20 ont été analysés avec le procédé de détection décrit précédemment. Des quantités croissantes de chaque  
30 extrait ont été déposées sur les gels. En parallèle, des protéines colorées (PC) de poids moléculaires connus ont été déposées et ont permis de faire une estimation du poids moléculaire apparent des bandes détectées avec  
35 l'anticorps anti-kin17.

La figure 3B : compétition avec la protéine

kin17.

**EXEMPLE 7 : Liaison préférentielle de la protéine kin17 aux structures courbées de l'ADN.**

1) La protéine kin17 interagit avec l'ADN  
5 d'une façon spéciale. Elle reconnaît spécifiquement la structure de l'ADN courbé. Une courbure particulière de l'ADN peut être produite par des lésions importantes de l'ADN qui induisent la recombinaison génétique et la réparation du matériel génétique. L'expression de la pro-  
10 téine kin17 doit donc être modifiée dans des cellules déficientes pour une des voies de réparation de l'ADN. On a testé la concentration relative de la protéine kin17 dans les extraits protéiques de cultures primaires de fibroblastes de patients atteints de Trichothiodystrophie  
15 (TTD) ou de *Xeroderma pigmentosum* (X.p.). Ces deux maladies génétiques sont dues à des défauts dans la réparation de l'ADN. On a observé que le taux de protéine kin17 dans les fibroblastes de plusieurs malades est au moins 5 fois inférieur au taux de protéine kin17 détecté dans les  
20 fibroblastes normaux.

La figure 4 illustre la détection de la protéine kin17 dans des cultures primaires de fibroblastes normaux et de patients X.p. et TTD : DI = détection immunologique de la protéine kin17 ; PT = coloration de protéines présentes sur la membrane avec le rouge ponceau ;  
25 MPC = marqueurs de poids moléculaires précolorés.

2) Pour caractériser les propriétés de liaison à l'ADN de la protéine kin17, dont la structure est rappelée à la figure 12, l'affinité de cette protéine vis-à-vis d'ADN simple-brin et double-brin a été testée.  
30

Comme le montre la figure 13, la protéine kin17 se lie à la fois aux simple-brins et aux double-brins avec la même efficacité.

La figure 15 montre l'affinité particulière de  
35 la protéine kin17 pour l'ADN courbé présent dans le plasmide pBR322, plus particulièrement en présence de zinc

(figure 14).

La protéine kin17 se lie préférentiellement à une région située dans le fragment Pst I-Hind III de 777 pb (figure 15A). Ce fragment inclut la région C8 de  
5 haute courbure (figure 15B).

La protéine kin17 constitue un excellent marqueur d'une déficience de la capacité d'une cellule à réparer sur ADN.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède,  
10 l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écar-  
15 ter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

## REVENDEICATIONS

1') Préparation purifiée de la protéine kin17 de souris, caractérisée en ce qu'elle présente un "doigt de zinc" capable de fixer les ions  $Zn^{++}$  réactifs, en ce qu'elle est capable de reconnaître l'ADN simple- ou double-brin et notamment les régions courbées de l'ADN double-brin, en ce qu'elle présente un poids moléculaire apparent de 43 000 daltons, et en ce qu'elle est reconnue aussi bien par les anticorps anti-protéine kin17 que par les anticorps anti-protéine recA d'*Escherichia coli*.

2') Préparation purifiée de la protéine kin17 selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend un certain nombre de fragments peptidiques aptes à être utilisés comme réactifs de détection de la protéine kin17.

3') Fragment peptidique selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de 15 aminoacides (peptide D-16-Y), de séquence : Asp-Glu-Glu-Lys-Thr-Ala-Lys-Phe-Ile-Glu-Glu-Gln-Val-Arg-Arg, qui correspond à la région de la protéine kin17, homologue à la protéine recA d'*E.coli*.

4') Fragment peptidique de la protéine purifiée kin17 selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de 11 aminoacides (peptide Y-13-K), de séquence : Gln-Lys-Gln-Cys-Arg-Asp-Glu-Asn-Gly-Phe-Lys, qui se trouve dans le domaine fonctionnel dénommé doigt de zinc.

5') Anticorps anti-protéine kin17, caractérisés en ce qu'il sont obtenus par immunisation de mammifères et notamment de lapins avec une suspension antigénique constituée par la préparation purifiée de protéine kin17 selon la revendication 1.

6') Anticorps anti-protéine kin17, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des anticorps anti-fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 2, 3 ou 4.



7') Anticorps selon la revendication 6, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des anticorps polyclonaux.

5 8') Anticorps selon la revendication 6, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des anticorps monoclonaux spécifiques de chacun des peptides selon la revendication 2 ou la revendication 3.

10 9') Séquence nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle est constituée par la séquence d'ADN génomique KIN17 murin, en ce qu'elle possède au moins deux introns, dont l'un se situe au niveau du nucléotide 137 et l'autre entre les nucléotides 339 et 429 de l'ADNc murin codant pour la protéine kin17, comprenant 1414 paires de bases et de formule I suivante :

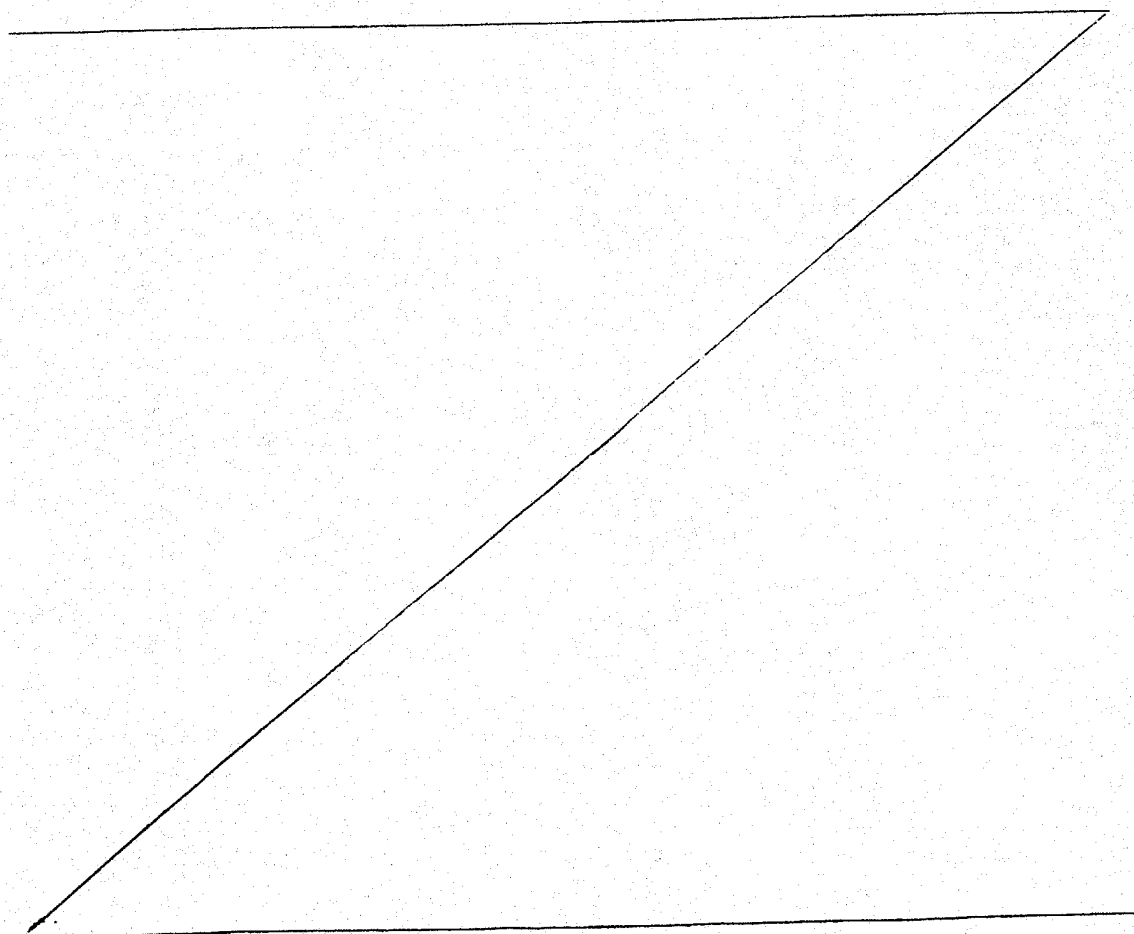
15

20

25

30

35





11') Oligonucléotide selon la revendication  
10, dénommé oligonucléotide B, caractérisé en ce qu'il  
présente la séquence de formule B suivante :

AGGCGGAAAGAACCAGGGGATCCC

5 12') Oligonucléotide selon la revendication  
10, dénommé oligonucléotide C, caractérisé en ce qu'il  
présente la séquence de formule C suivante :

GCGAGTCCCAGCGGTACC

10 13') Oligonucléotide selon la revendication  
10, dénommé oligonucléotide D, caractérisé en ce qu'il  
présente la séquence de formule D suivante :

GACCTTGAAGACTCCGCTGCGAA

15 14') Oligonucléotide selon la revendication  
10, dénommé oligonucléotide E, caractérisé en ce qu'il  
présente la séquence de formule E suivante :

ACTGCCAAGTTCATTGAG

15 15') Oligonucléotide selon la revendication  
10, dénommé oligonucléotide F, caractérisé en ce qu'il  
présente la séquence de formule F suivante :

20 TTCTTCTTCTCAGCCGGGACCTA

10, dénommé oligonucléotide G, caractérisé en ce qu'il  
présente la séquence de formule G suivante :

TCGAAGAGGAAAAGAAAAGGACCG

25 17') Oligonucléotide selon la revendication  
10, dénommé oligonucléotide I, caractérisé en ce qu'il  
présente la séquence de formule I suivante :

CTGGAACTTCTGAGGCGACGCTT

30 18') Oligonucléotide selon la revendication  
10, dénommé oligonucléotide J, caractérisé en ce qu'il  
présente la séquence de formule J suivante :

CCGACCATGTAAGTCATCTATCTG

35 19') Oligonucléotide selon la revendication  
10, dénommé oligonucléotide K, caractérisé en ce qu'il  
présente la séquence de formule K suivante :

CATCAGCCACCGAGAGCACATC.

20') Oligonucléotide selon la revendication 10, dénommé oligonucléotide L, caractérisé en ce qu'il présente la séquence de formule L suivante :

AGCTGCTGCAGCAGCTTATCG.

5 21') Oligonucléotide selon la revendication 10, dénommé oligonucléotide S, caractérisé en ce qu'il présente la séquence de formule S suivante :

AGCCCCAAGGCCATCGCCAA.

10 22') Paire d'amorces pour la synthèse et/ou la détection de l'ADN génomique ou d'un produit de transcription du gène KIN17, caractérisée en ce que chaque amorce comprend une séquence ou un fragment de séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 10 à 21.

15 23') Paire d'amorces selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un oligonucléotide de formule E apparié avec un oligonucléotide de formule F.

20 24') Paire d'amorces selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un oligonucléotide de formule I apparié avec un oligonucléotide de formule J.

25 25') Paire d'amorces selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un oligonucléotide de formule K apparié avec un oligonucléotide de formule J.

30 26') Sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence nucléotidique ou un fragment de séquence selon l'une quelconque des revendications 10 à 21, éventuellement marquée à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou un fluorochrome.

35 27') Séquence de l'ADNc humain caractérisée en ce qu'elle code pour la protéine kin17 et comprend 2400 paires de bases.

28') Plasmide contenant l'ADNc du gène KIN17

humain, caractérisé en ce qu'il est dénommé XLpHK17 et a fait l'objet d'un dépôt auprès de la CNCM sous le n° I-1316 en date du 08 juin 1993.

29') Réactif utilisable pour la détection, le diagnostic et le suivi de remaniements chromosomiques chez un mammifère, après exposition à un agent génotoxique, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe constitué par les réactifs immunologiques sélectionnés parmi la préparation de protéine kin17 purifiée selon la revendication 1, les fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, les anticorps anti-peptides et les anticorps anti-protéine kin17 purifiée, selon l'une quelconque des revendications 5 à 8 et les réactifs nucléotidiques sélectionnés parmi les séquences d'ADN génomique murin codant pour la protéine kin17 ou leurs fragments et les séquences d'ADNc humain codant pour la protéine kin17 ou leurs fragments selon l'une quelconque des revendications 9 à 27.

30') Procédé de dépistage de remaniements chromosomiques chez les mammifères, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en contact une cellule humaine (lymphocytes notamment) appropriée avec un réactif selon la revendication 29, apte à détecter la présence d'une protéine, dont la production est induite par un toxique génétique.

31') Procédé de dépistage selon la revendication 30, caractérisé en ce que l'on détecte la protéine kin17 produite par une cellule appropriée, en mettant en présence ladite cellule avec un réactif immunologique sélectionné parmi les réactifs du groupe qui comprend la préparation de protéine kin17 purifiée, les fragments peptidiques de ladite préparation, les anticorps anti-peptides et les anticorps anti-protéine kin17 purifiée, selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

32') Procédé selon la revendication 31, caractérisé en ce que le réactif immunologique est fixé sur un

support solide approprié.

33\*) Procédé selon la revendication 31, caractérisé en ce que l'on détecte l'ADN génomique, les ARN messagers et/ou les produits de transcription du gène  
5 KIN17,

(1) en mettant en contact l'échantillon biologique à analyser, traité pour extraire l'acide nucléique recherché avec une paire d'amorces selon l'une quelconque des revendications 18 ou 19, pour amplifier au moins un  
10 fragment dudit ADN ou ARN,

(2) après quoi, la séquence d'ADN ou d'ARN amplifiée est détectée par au moins une sonde nucléotidique selon la revendication 26.

34\*) Procédé de détection d'une modification  
15 chromosomique, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) l'extraction de l'ADN ou de l'ARN à partir de cellules appropriées,

(2) leur mise en contact avec une protéine  
kin17,

(3) la quantification de l'ARNm KIN17,

(4) la détermination du rapport concentration  
20 ARNm KIN17/ADN total.

35\*) Kit de détection d'une modification chromosomique chez l'Homme, caractérisé en ce qu'il comprend,  
25 outre les réactifs usuels, des anticorps anti-protéine kin17 de souris selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, pour l'immunodétection rapide et sensible de la protéine kin17 dans des extraits totaux de cellules humaines par Western blot ou par immunofluorescence.

30 36\*) Kit de détection de la protéine kin17 par la méthode ELISA ou RIA, caractérisé en ce qu'il comprend, outre les réactifs usuels, des anticorps anti-protéine kin17 de souris selon la revendication 5 et un couple d'anticorps selon la revendication 6, dirigés cha-  
35 cun contre un peptide choisi parmi les peptides selon l'une quelconque des revendications 2 à 4.



2/14

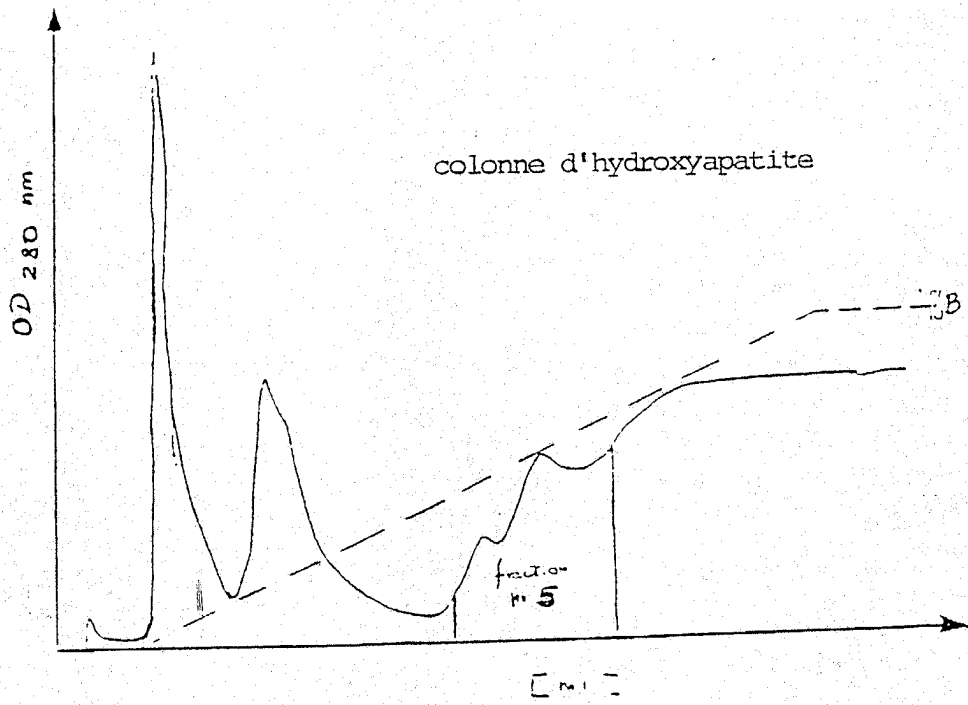


FIGURE 2



3/14

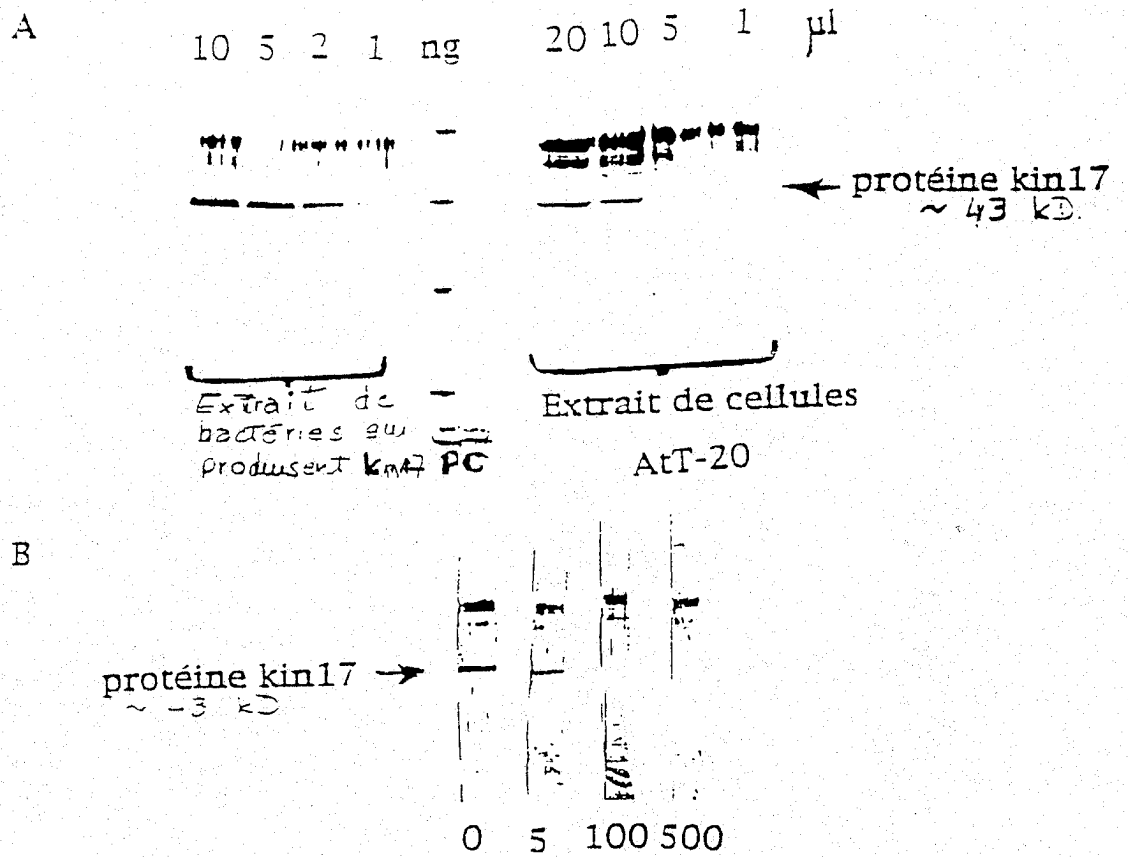


FIGURE 3

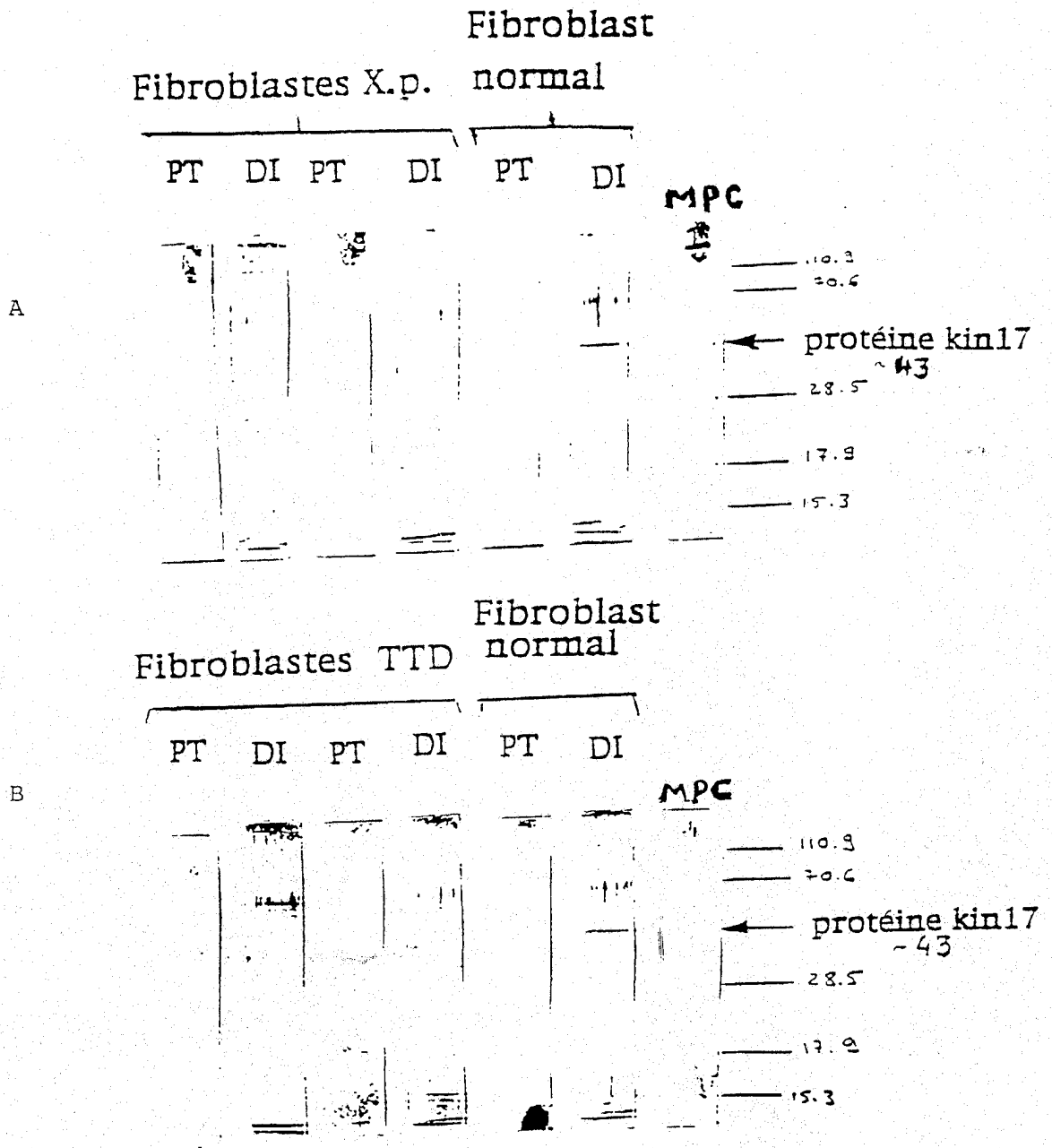


FIGURE 4

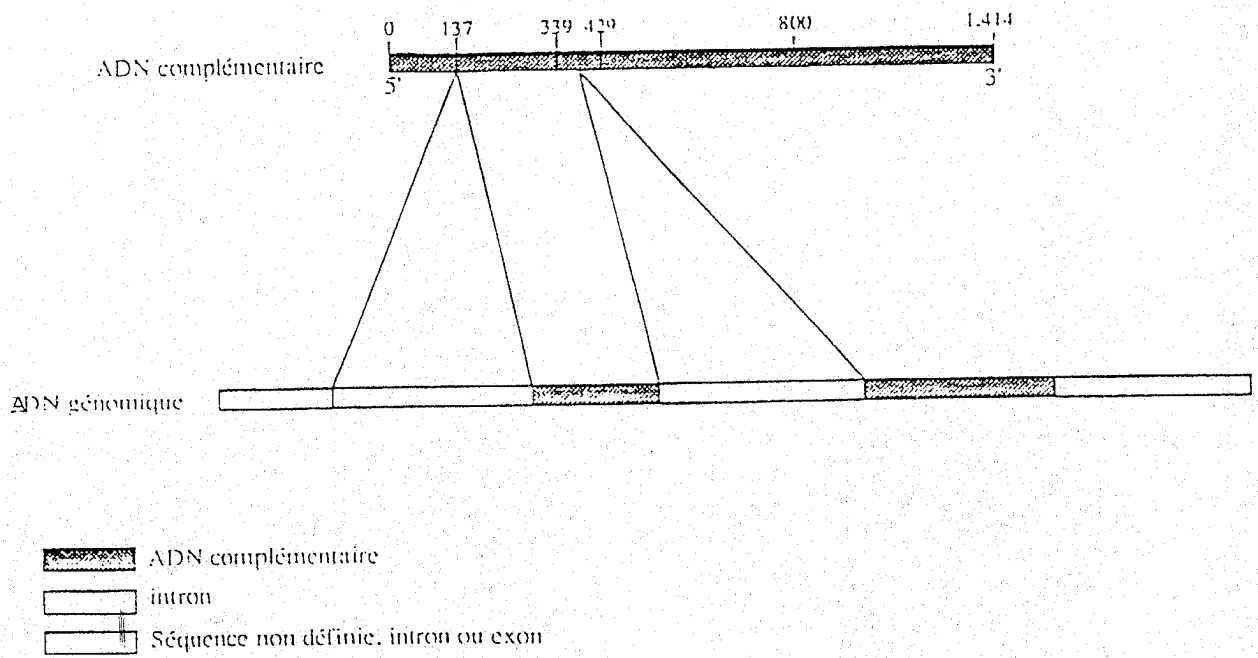


FIGURE 5

6/14

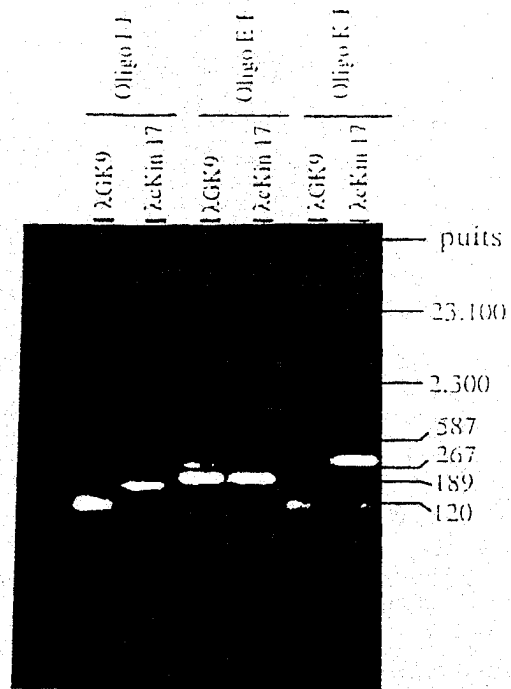
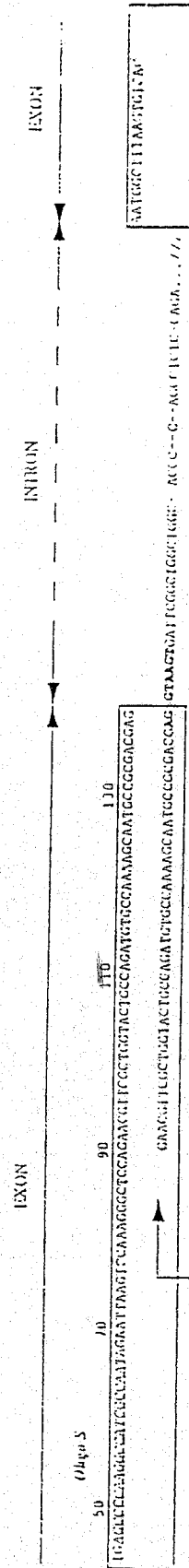
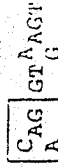


FIGURE 6



SÉQUENCE CONSENSUS  
DU SITE D'ÉPISSAGE EN 5'

5'exon    intron



(Wilson et al., 1989)

... séquence de l'ADN génomique  
(méthode de séquençage direct  
de l'ADN double brin plasmique)

Séquence de l'ADNc  
(Figure 4)

FIGURE 7

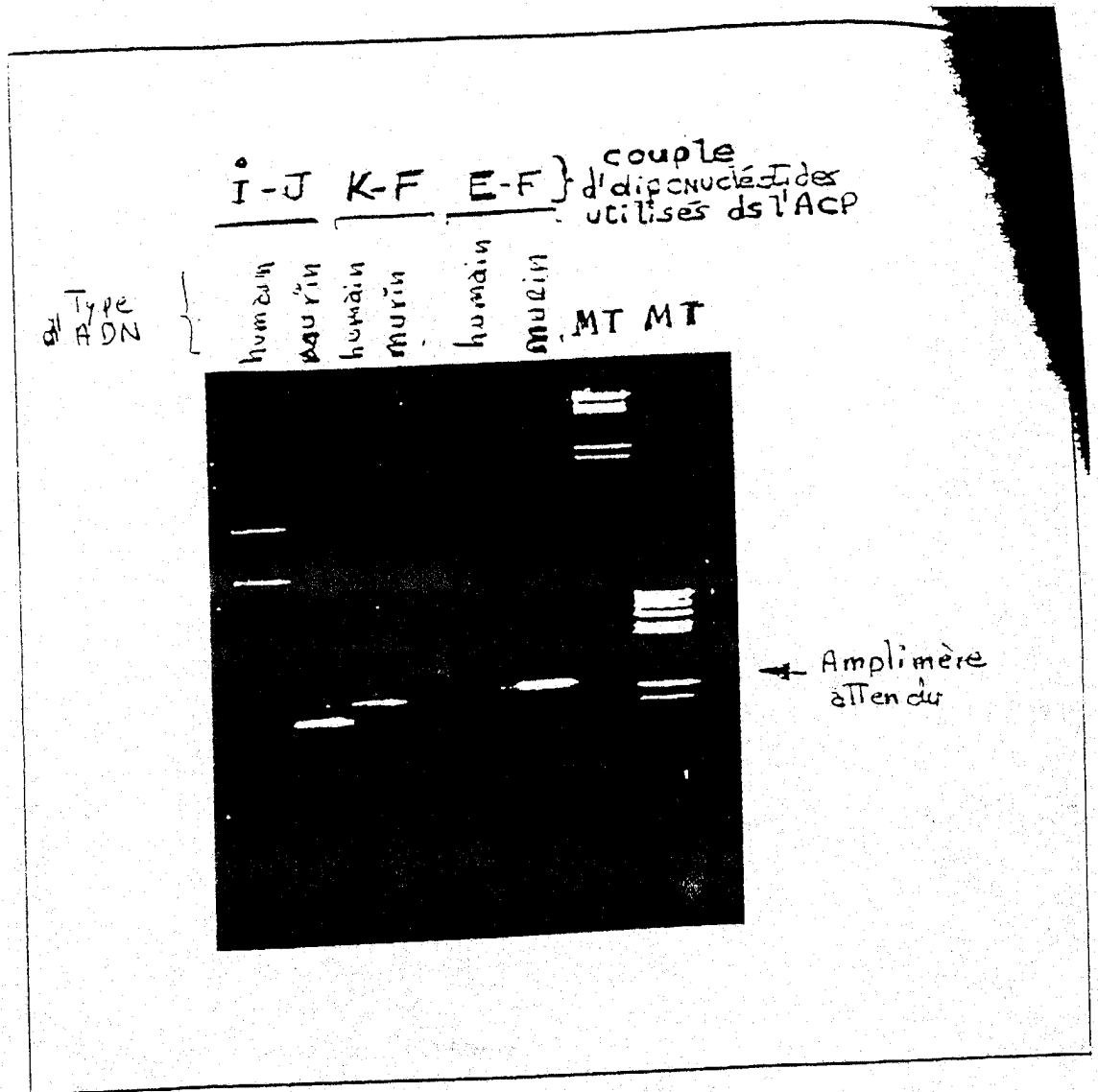


FIGURE 8

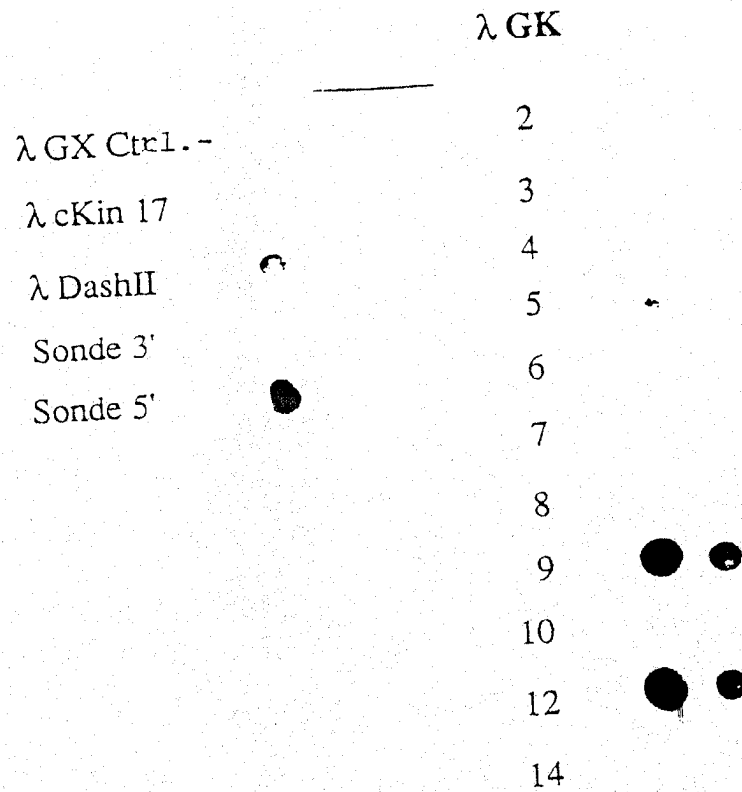
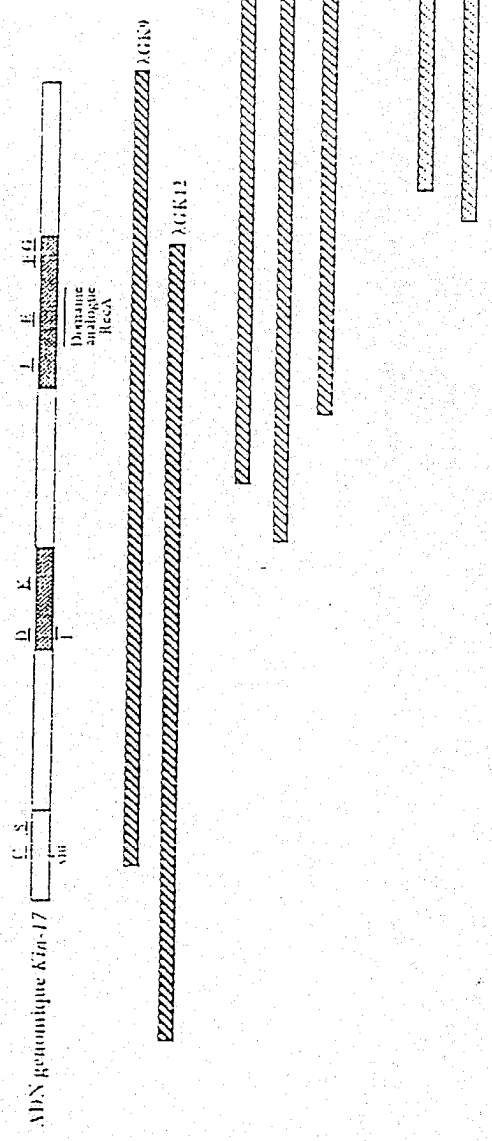


FIGURE 9



- ADN complémentaire, exon
  - intron
  - ▭ Séquence non définie, intron ou exon
  - ▨ Insert phagique contenant FATG d'initiation
  - ▩ Insert phagique contenant la partie centrale de l'ADN génomique
  - ▧ Insert phagique contenant la partie terminale de l'ADN génomique
- N. Oligonucléotide appartenant à l'ADN complémentaire

FIGURE 10



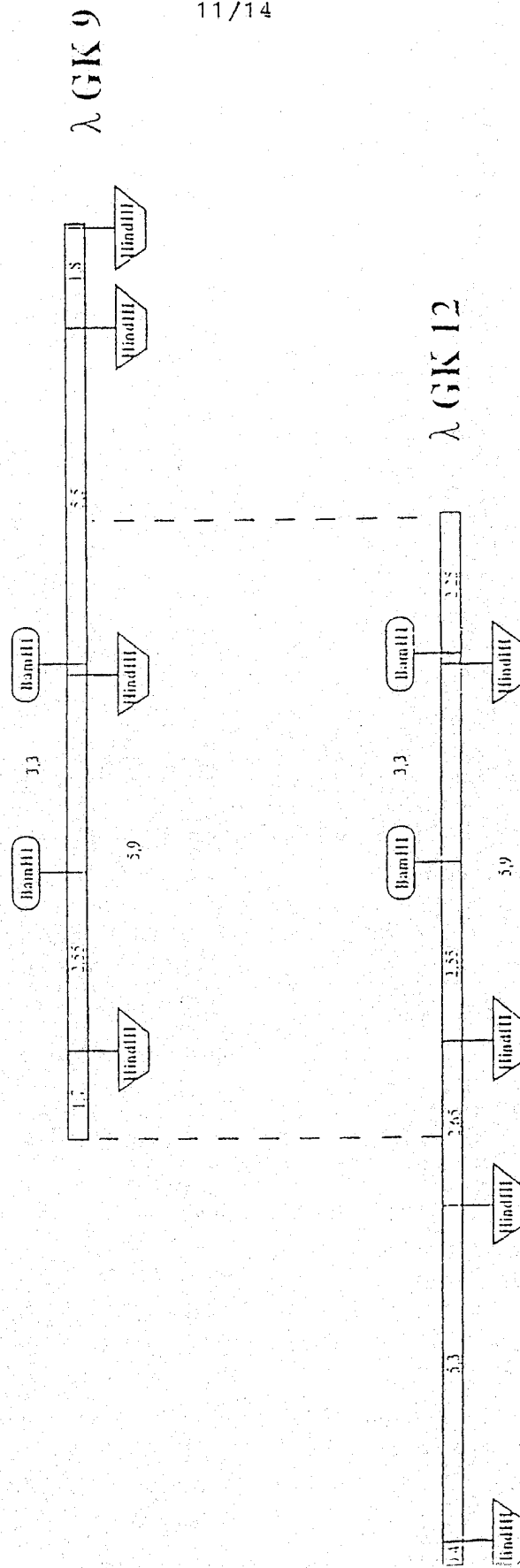
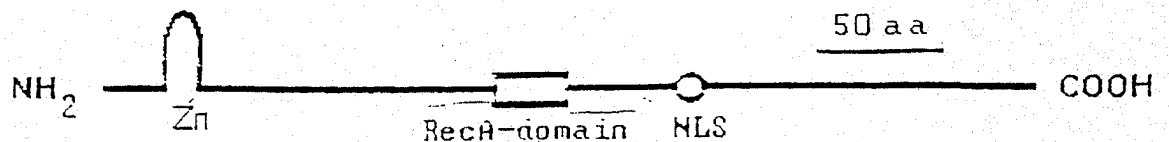


FIGURE 11

12/14

## A. Carte de séquence schématique de la kin17



## B. Sequences de NLS

	198	210	240	246
mPARP	QLPGIKNEGK	RRKGDEVDGTDEVA	KKKSRKETDKYSKLEK	KALKAQNELIW
	:	:	:	:
kin17	235	245	255	265
	RLGSAASGK	RKRESSOSSAOPAK	KKKKSALDEIMELEEE	KKRTARTD-AW
	:	:	:	:
hPARP	OLPGVKSEG	KRKGDEVDGVDEVA	KKKSKKEKDKDSKLEK	KALKAGNDLIW

## C. Sequences du doigt de zinc

	125	135	140	150	160	170	180	194
mPARP	IKGCLEKIEK	GQMRLSKKMVDPEK	POLGMID-RWYH	PTCFVKKRDELGFRPEY	-SASQLKGFSL	LLSAEDKEA		
	:	:	:	:	:	:	:	:
kin17	NH <sub>2</sub> -HGK	SDF-LSPKAI	ANRIKSKGLONVRWY	QMCQKQCRDENG	FKCHCMSESH	QRQL-LLASEN	PQQ	
	:	:	:	:	:	:	:	:
hPARP	IKGCMEKID	KGOVRLSKKMVDPEK	POLGMID-RWYH	PGCFVKNREELGFRPEY	-SASQLKGFSL	LATEDKEA		

FIGURE 12

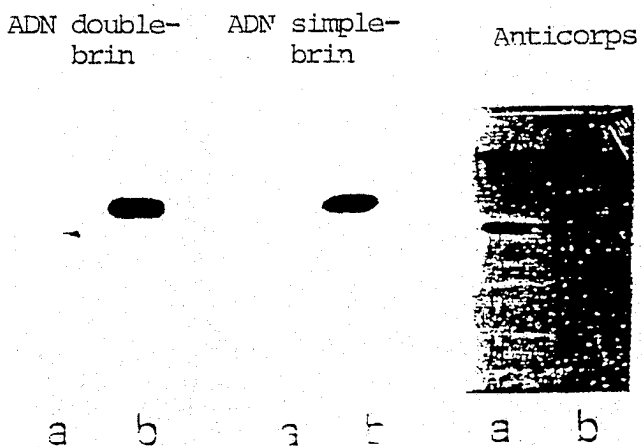


FIGURE 13

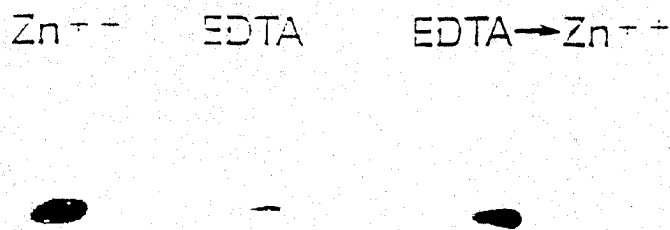
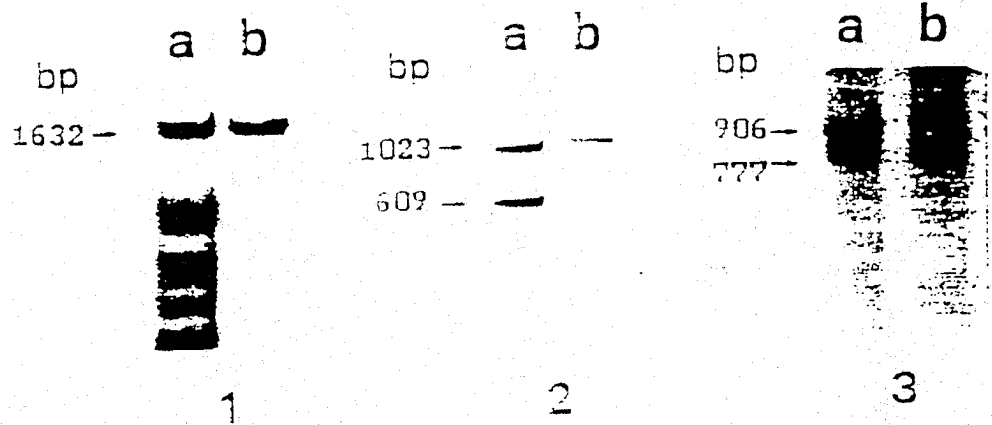


FIGURE 14

A



B

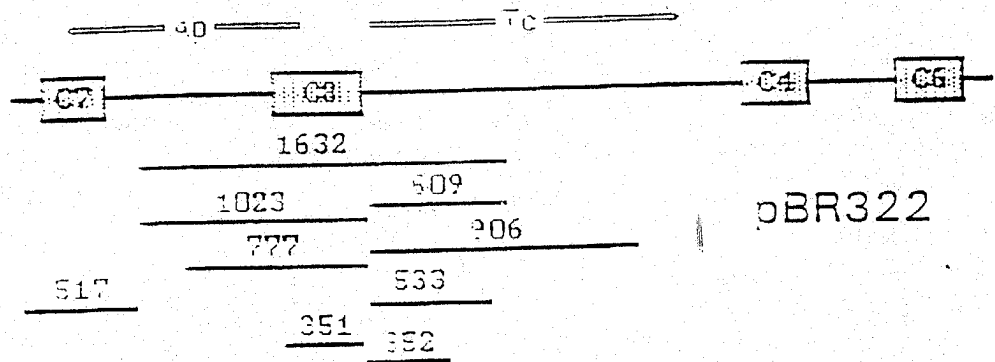


FIGURE 15

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D, X	<p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 19, no. 19, Octobre 1991, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 5117 - 5123 JAIME F. ANGULO ET AL. 'Identification and expression of the cDNA of KIN17, a zinc-finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new DNA-binding protein' * abrégé * * page 5117, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, alinéa 3 * * page 5118, colonne de gauche, alinéa 3; figure 1 * * page 5119, colonne de droite, alinéa 3 -alinéa 5 * * page 5120, colonne de droite, dernier alinéa - page 5121, colonne de gauche, alinéa 2 * * page 5121, colonne de gauche, alinéa 5 * * page 5121, colonne de droite, alinéa 3 - page 5122, colonne de gauche, alinéa 1 *</p>	1,2,5,9, 26
X	<p>EMBL Database entry HSPTX3R Accesion number S14622; 21 Juin 1991 ANGULO, J. ET AL.: 'Molecular cloning of KIN17, a mouse cDNA encoding a new zinc-finger protein immunologically related to RecA' * abrégé *</p>	1,2
A	<p>JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY. KEYSTONE SYMPOSIA ON MOLECULAR &amp; CELLULAR BIOLOGY Supplement 16B, 1992; page 94 * abrégé F623 *</p>	9,27,28

DOMAINES TECHNIQUES  
RECHERCHES (Int.Cl.5)

C07K  
C12Q  
C12N  
G01N

Date d'achèvement de la recherche

14 Février 1994

Examinateur

Montero Lopez, B

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul  
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un  
autre document de la même catégorie  
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication  
ou arrière-plan technologique général  
O : divulgation non-écrite  
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention  
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure  
à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date  
de dépôt ou qu'à une date postérieure.  
D : cité dans la demande  
L : cité pour d'autres raisons  
& : membre de la même famille, document correspondant

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 488691  
FR 9307171

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY. KEYSTONE SYMPOSIA ON MOLECULAR & CELLULAR BIOLOGY Supplement 15D, 1991; page 112 * abrégé J200 *	9,27
	---	
D,A	BIOCHIMIE vol. 73, no. 2-3 , Février 1991 pages 251 - 256 JF ANGULO ET AL. 'Identification of a mouse cDNA fragment whose expressed polypeptide reacts with anti-recA antibodies' * abrégé * * page 253, colonne de gauche, alinéa 1 - colonne de droite, alinéa 2; figure 3 *	9,27
		-----
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.C1.5)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
14 Février 1994		Montero Lopez, B
<p style="text-align: center;"><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un  autre document de la même catégorie  A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication  ou arrière-plan technologique général  O : divulgation non-écrite  P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure  à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date  de dépôt ou qu'à une date postérieure.  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

3

EPO FORM 1503 01.82 (POMC13)